

## 총설

## 유산균의 분자 생물학적 육종

김 왕 준  
생물공학연구부

## 초 록

유산균은 발효유, 치즈, 발효 sausage 및 채소의 생산에 널리 이용되고 있다. 과거 15~6년간 이들 유산균에 대한 경제적 중요성은 매우 증가하였으며 이에 따라 유산균의 유전학과 plasmid biology를 이해함으로써 이들 균에 대한 분자 생물학적 육종에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다.

유산균에서 잘 기능을 하는 cloning vector들이 많이 개발되었으며 transduction, conjugation, transformation, electroporation 등의 외부 유전자를 전달하는 방법으로 보다 개발된 유산균이 육종되어 왔다. 이 총설은 산업적으로 유용가치가 높은 유산균의 육종에 관한 최신동향 및 앞으로의 전망 등에 관하여 논의하고자 한다.

## 1. 서 론

1970년대 초반 제한효소(restriction enzyme)의 발견은 유전공학의 초석이 되었다. 그 이후로 생물공학(biotechnology)의 기법을 이용하여 식품 발효에 쓰이는 미생물의 분자생물학적인 육종가능성이 타진되기 시작하였다. 초기에는 대부분 Gram음성균인 *E. coli*를 이용한 실험실적 연구가 진행되었다. 그러나 *E. coli*를 이용한 기술을 이용하여 점차적으로 Gram양성균인 유산균의 이용쪽으로 발전되고 있다. 본 논문에서는 주로 미국 및 Europe에서 진행되어온 연구를 중심으로 유가공 및 육가공에 이용되는 유산균의 분자생물학적 연구를 소개하고자 한다.

## 2. 자연적 유전자 전달방법

다른 group의 세균과 마찬가지로 유산균에서 자연현상으로 일어나는 유전자 전달의 발견은 이들 세균의 유전과 plasmid biology를 이해하는데 큰 도움이 되었다. Transduction과 Conjugation은 특히 lactococci에서 잘 알려진 방법이다.

Transduction 몇몇 bacteriophage는 숙주세포(host cell)를 벗어나면서 숙주세포의 Chromosome이나 plasmid의 일부를 떼어서 또다른 숙주세포에게 전달한다. 이런 현상을 transduction이라고 한다. Lactococci에서 일어나는 transduction에 대한 첫번째 보고는 1960년대 초에 발표되었

다. 이 transduction은 유산균의 육종에 이용될 수 있는 아주 단순한 방법이나 몇가지 제약이 있다. 그것은 매우낮은 성공률과 동종이나 매우 유사한 균 사이에서만 일어난다는 점이다.

**Conjugation** 세균과 세균이 직접 접촉하여 공여체(donor cell)로부터 수혜자(recipient cell)로 plasmid가 전달되는 현상을 conjugation이라 한다. 이때 conjugation이 일어나는 환경이나 방법에 따라 eroth mating, solid surface mating, filter mating 등으로 불리우기도 한다. 유산균의 conjugation에 관한 첫번째 보고는 Kempler와 McKay 등에 의해 발표되었다.

이때 전달되는 plasmid는 자신스스로가 전달할 수 있는 능력(Tra<sup>+</sup>)이 있는 plasmid(self-transmissible)와 다른 요소의 도움에 의해서 가능한 plasmid인 nonconjugative 형태가 있다.

### 3. Transformation

Conjugation이나 transduction 등 자연적 현상의 발견은 유산균의 유전과 plasmid biology를 이해하는데 큰 도움이 되었으나 본격적인 유산균의 육종에 위에서 언급한 두가지 방법을 이용함에는 많은 한계가 있다. 만약 재조합 DNA를 숙주세포에 주입하고자 할 경우 위의 두 방법을 이용할 수 없게 된다. 균주의 접합이나 bacteriophage의 도움이 없이 분리정제된 DNA를 숙주세포에 인위적으로 도입하는 방법을 광범위하게 transformation이라 한다. 이때 문제가 되며 이 방법의 최대 관건이 바로 숙주세포의 세포벽과 세포막이다. 정상적인, 다시 말하면 자연상태에서는 숙주세포가 외부로부터 DNA를 받아들이는 것은 아주 드물며 설사 그러하다 하더라도 세포의 생활환경(life cycle)의 극히 짧은시기에 지나지 않는다. 이 현상을 competence라고 한다. 초기의 연구는 이 competence를 이용하는 방법밖에는 없었으나 점차 기술이 개발되어 그 효율이 많이 향상되었다.

### Protoplast transformation

이 방법은 host cell의 세포벽을 세포벽 용해효소(lysing enzyme)인 lysozyme이나 mutanolysin 등으로 부분적 또는 거의다 제거하여 등장액인 삼투압 안정제와 PEG가 함유된 buffer에 전달하고자 하는 재조합 DNA(주로 plasmid)를 가하여 그 전달을 용이하게 한후 다시 세포벽을 재생시키는 방법이다. 그러나 이방법 역시 낮은 수율 및 재현성의 결여로 많은 개선이 요구된다.

### Electroporation

위에서 열거한 competence나 protoplast transformation 기법은 그 수율이 극히 낮아 최근 개발된 기법이 electroporation 방법이다. 우리말로 “전기천공에 의한 형질전환”이라고 번역할 수 있는 이 기법은 숙주세포를 ion 등의 농도가 극히 낮은 buffer에 넣은 후 순간적으로 수천 V의 고압을 걸어주어 순간적으로 세포벽과 막에 구멍을 만들어 외부의 DNA를 집어넣는 적극적인 방법이다. 이 방법을 이용할 경우 특별히 고려해야 할 사항은 buffer의 조성, 전압, 배양액조성, 균의 생육정도, 균의 농도, wash buffer의 조성 및 온도 등 매우 복잡하다. 지금까지 개발된 방법중 가장 그 성능이 뛰어난 방법이다. 최근에는 1 $\mu$ g DNA당 약 10<sup>4</sup>의 transformants가 보고되기도 한다.

### 4. 목표 gene

산업적으로 중요한 유산균의 형질은 여러가지가 있으나 분자생물학적 육종을 위한 target gene 등은 다음과 같다 : ① Lac<sup>+</sup> gene; lactose를 이용할 수 있는 gene, ② Prt<sup>+</sup>; 배지의 protein을 이용할 수 있는 gene, ③ Cit<sup>+</sup>; citrate를 이용할 수 있는 gene, ④ R/M; bacteriophage에 내성을 갖는 gene, ⑤ Bac<sup>+</sup>; bacteriocin 생성 gene 이를 중요한 gene 등은 대부분 Plasmid에 위치하고 있다.

그러므로 유산균의 유전적 및 생물공학적 연구에 이 plasmid들의 기능 및 발현을 연구하는 plasmid biology가 필수적인 것이다.

## 5. 사용 Vector

유산균의 cloning을 위한 많은 Vector들이 개발되어 있다. 이들의 대부분은 비교적 발현범위가 넓은 천연의 Vector이거나 재조합 plasmid들이다.

최근에는 지금까지 일반적으로 사용되어 오던 항생제 내성 marker 대신 Lac<sup>+</sup>, Bac<sup>+</sup>, Suc<sup>+</sup> 등 생리적 marker(physiological marker)를 이용하는 추세이다. 이는 유산균은 인류가 상음해오던 균이므로 항생제 내성 marker의 이용은 인체에 항생제 내성을 키워주는 결과를 발생하므로 인체에 전혀 해를 주지 않는 생리적 marker를 이용하여 cloning하는 것이 일반적인 동향이며 앞으로도 이런 방향으로 진행될 것이다.

## 6. 앞으로의 전망

유산균의 식품공업 및 의약품, 화장품 산업에의 이용은 점차적으로 증가하고 있다. 이에 따라 보다 개발된 형질을 가진 유산균의 육종은 점차 그 연구의 강도가 높아질 것으로 생각된다. 이에 따라 유

산균내에서 발현이 잘되며 그 크기가 작고 다른 Gram음성이나 Gram 양성균에서는 발현이 잘되며(shuttle vector) 항생제 내성 marker가 없는(생리적 marker를 가지는) 재조합 plasmid의 개발과 또 transposon을 이용한 외부유전자의 전달, 향미성분의 대량생산을 위한 시도, Bacteriocin의 생산에 대한 연구 등 많은 다양한 연구가 시도될 것이다. 그러나 불행하게도 우리나라에서는 이 분야의 연구가 극히 부진한 실정이다. 우리나라의 전통식품에서도 이들 유산균이 직·간접적으로 작용하는 식품들이 많다. 김치, 간장, 식해 등 선조들이 경험적으로 만들어왔던 식품들의 국제화 내지는 그 저장성의 연장 등을 위해서는 우리도 우리 전통식품에 관여하는 유산균을 많이 분리·동정하여 이들 균의 plasmid biology와 몇몇 target gene을 설정하여 보다 집중적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 참 고 문 헌

1. W.J. Kim., Development of Plasmid Transfer Systems in Lactic Acid Bacteria Used in Meat Fermentation, Ph. D. Dissertation, University of Wyoming
2. Proceeding of the 23rd International Dairy Congress